



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN
CIENCIAS ODONTOLÓGICAS**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENTES AGENTES
ANTIBACTERIANOS EN *BIOFILMS* ORALES *IN*
VITRO FORMADOS SOBRE DISTINTAS
SUPERFICIES DE IMPLANTES DENTALES**

Rita de CássiaMeirelesRodrigues

TUTOR: David Herrera González

Junio 2014

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Objetivos e Hipótesis.....	16
4. Materiales y Métodos.....	17
4.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.....	17
4.2. Superficies seleccionadas.....	18
4.3. Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas.....	18
4.4. Formación del <i>biofilm</i> en las superficies seleccionadas.....	21
4.5. Colutorios utilizados.....	22
4.6. Exposición a los colutorios.....	22
4.7. Análisis de las bacterias viables mediante técnica de cultivo.....	23
4.8. Análisis estadístico de los datos.....	23
5. Resultados.....	24
5.1. Efecto <i>in vitro</i> de la formulación antiséptica con aceites esenciales como principio activo (Listerine®) en los <i>biofilms</i> bacterianos sobre la superficie de zirconio.....	25
5.2. Efecto <i>in vitro</i> de la formulación antiséptica con aceites esenciales como principio activo (Listerine®) en los <i>biofilms</i> bacterianos sobre la superficie de titanio.....	27
5.3. Comparativa del efecto antiséptico de las formulaciones con Aceites Esenciales (Listerine®) en los <i>biofilms</i> generados sobre las superficies de zirconio y titanio.....	29
5.4. Efecto <i>in vitro</i> de la formulación antiséptica con Clorhexidina y Cloruro de Cetil Piridinio (PerioAid®) en los <i>biofilms</i> bacterianos sobre la superficie de zirconio	31
5.5. Efecto <i>in vitro</i> de la formulación antiséptica con Clorhexidina y Cloruro de Cetil Piridinio (PerioAid®) en los <i>biofilms</i> bacterianos sobre la superficie de titanio	33
5.6. Comparativa del efecto antiséptico de las formulaciones con Clorhexidina y Cloruro de Cetil Piridinio (PerioAid®) en los <i>biofilms</i> generados sobre las superficies de zirconio y titanio	35
6. Discusión.....	37
7. Conclusiones	42
8. Agradecimientos.....	43
9. Bibliografía.....	44

1. RESUMEN

Antecedentes y objetivos: Se ha demostrado que las bacterias orales organizadas en *biofilm* están implicadas en la etiología y el desarrollo de las enfermedades peri-implantarias, como son la mucositis y la peri-implantitis, asociadas al uso de implantes dentales. Aún hoy en día no se ha llegado a un consenso en cuanto al material más favorable para evitar el desarrollo de la infección o el tratamiento más adecuado para combatirla. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el comportamiento de las bacterias orales organizadas en *biofilm* formado sobre dos materiales de uso habitual en la terapia de implantes frente a la exposición a diferentes agentes antibacterianos.

Materiales y Métodos: Se emplearon seis cepas de referencia estándar para desarrollar *biofilms* bacterianos sobre discos de zirconio y titanio en un modelo *in vitro* en modalidad estática. Las especies seleccionadas representan colonizadores iniciales (*Streptococcus oralis* y *Actinomyces naeslundii*), tempranos (*Veillonella parvula*), secundarios (*Fusobacterium nucleatum*) y tardíos (*Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Los *biofilms* desarrollados se trataron por inmersión, durante 1 minuto, con dos soluciones antisépticas: formulaciones con Aceites Esenciales y con Clorhexidina y Cloruro de Cetil Piridinio (CHX+CPC), respectivamente, así como a una solución salina control (PBS). El estudio de las bacterias viables antes y después de la exposición a las soluciones se llevó a cabo por la técnica de cultivo estándar en medio agar sangre suplementado. Para cada material, se comparó el número de bacterias, transformadas en logaritmo (UFC/mL), entre aceites esenciales y PBS, y entre CHX+CPC y PBS mediante test t de Student. Las proporciones relativas (bacterias con cada producto activo en relación con las bacterias en PBS), se compararon entre materiales mediante t de Student pareada.

Resultados: Se detectaron diferencias estadísticamente significativas para *A. naeslundii* ($p=0,006$), cuando el *biofilm* formado en Zirconio era tratado con aceites esenciales, respecto a PBS, para *S. oralis* ($p=0,003$), también en *biofilm* formado en Zirconio y tratado con CHX+CPC, respecto al *biofilm* tratado con PBS. *A. naeslundii* ($p=0,031$), se formó significativamente menos en los *biofilms* tratados con aceites esenciales sobre zirconio, con respecto a los formados sobre titanio. El resto de las comparaciones no reflejaron diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones: De acuerdo con los resultados de este estudio *in vitro*, las bacterias organizadas en el *biofilm* formado sobre titanio y zirconio son igualmente susceptibles a los agentes antibacterianos evaluados.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales relacionadas con los *biofilms* microbianos orales se encuentran entre las enfermedades más prevalentes que afectan al ser humano y continúan afectando a la mayoría de la población mundial, incluida la población española (Sheiham&Netuveli 2002; Llodra-Calvo et al. 2002; Bravo-Pérez et al. 2006). Entre ellas destacan la caries dental, causadas por bacterias organizadas en forma de *biofilms* sobre las superficies dentarias, y las enfermedades periodontales, que incluyen la gingivitis, caracterizada por la inflamación de la encía, y la periodontitis, en la que además de la inflamación superficial hay destrucción de los tejidos de soporte, ligamento periodontal, hueso alveolar y cemento radicular.

Estas enfermedades bucales de origen infeccioso son las principales causas de pérdida dentaria en adultos, con las concomitantes consecuencias funcionales y estéticas que estas pérdidas conllevan. Para reponer los dientes perdidos se disponen de diferentes técnicas rehabilitadoras, basadas en el uso de prótesis dentales removibles o fijas, estas últimas soportadas por los dientes adyacentes. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha introducido el uso de implantes dentales osteointegrados como soporte tanto para prótesis fijas como removibles, sin necesidad de usar como pilares los dientes remanentes.

El implante dental se coloca mediante un procedimiento quirúrgico que se ha popularizado enormemente durante los últimos veinte años debido a su buen pronóstico, funcionalidad y las crecientes demandas estéticas. El proceso de colocación se resume en las siguientes etapas:

- La **instalación quirúrgica** del implante, sustituyendo la raíz natural del diente.

- La **osteointegración**, período de cicatrización del implante, fenómeno biofísico que produce la unión a nivel molecular del implante con la estructura ósea.
- El **sellado gingival** del implante, es decir, formación de tejidos blandos en torno a los implantes y en la unión de la mucosa gingival al cuello de dichos implantes dentales de forma similar a como lo hace con un diente natural.
- La confección y colocación de las **prótesis dentarias**.

Las técnicas de rehabilitación con implantes osteointegrados han revolucionado la práctica de la odontología, con innumerables rehabilitaciones que, antes del advenimiento de los implantes no eran posibles, y con resultados globales satisfactorios (Berglundh et al. 2002). Es evidente que los resultados altamente predictivos del uso de implantes osteointegrados ha supuesto un importante avance en la rehabilitación protética de los pacientes parcial y totalmente desdentados, sin embargo, los implantes osteointegrados no están exentos de problemas a medio y largo plazo. Actualmente están adquiriendo gran relevancia las enfermedades peri-implantarias.

Las enfermedades peri-implantarias son de origen infeccioso y de naturaleza inflamatoria, y están causadas por bacterias presentes en los *biofilms* orales, organizados sobre las superficies de los implantes, de las prótesis que soportan y de los tejidos blandos peri-implantarios (Langet al. 2011). Estas enfermedades incluyen dos entidades: la mucositis peri-implantaria, que describe la presencia de inflamación en la mucosa que rodea un implante, sin signos de pérdida del hueso de soporte; y la peri-implantitis, en la que además de la inflamación en la mucosa se observa la pérdida de tejido óseo de soporte (Zitzmann et al. 2008). La respuesta del huésped a la formación del *biofilm* sobre el implante incluye diversas reacciones inflamatorias que ocurren inicialmente en el tejido blando pero que pueden progresar y generar la pérdida del soporte óseo. La destrucción tisular en el compartimiento

óseo comienza en la región "marginal", cerca del cuello del implante y se desarrollan defectos óseos tipo cráter que se hacen visibles radiográficamente. En todo caso, la estabilidad del implante puede mantenerse durante períodos prolongados (Lindhe et al. 2009). Esta pérdida ósea posiblemente no se producirá si la identificación y tratamiento del proceso se realiza precozmente (Mombelli et al. 1998; Molina et al. 1994; Esposito et al. 2004). Las peri-implantitis se pueden clasificar también atendiendo a parámetros clínico-terapéuticos (Sánchez Salmerón, 2008).

Las enfermedades peri-implantarias, como la peri-implantitis, pueden conllevar el fracaso del implante. La pérdida de implantes dentales en un tratamiento odontológico constituye un problema para los profesionales y para los pacientes que necesitan garantía de una buena salud bucal. Estudios recientes sobre la prevalencia de estas entidades, indican que la mucositis peri-implantaria afectaría al 80% de los sujetos que portan implantes dentales, y al 50% de dichos implantes. La peri-implantitis afectaría al 28-56% de los sujetos y entre el 12-43% de los implantes (Zitzmann & Berglundh 2008), lo que indica que la prevalencia de estas infecciones peri-implantarias es similar a las de las enfermedades periodontales (Lindhe & Meyle 2008).

A raíz del gran desarrollo de esta técnica en los últimos años, como una opción para tratamientos dentales y los problemas derivados de la aparición y maduración del *biofilm* peri-implantario, se ha estimulado la investigación tratando de entender las maneras de minimizar errores en su empleo. Distintos autores (Quirynen & Bollen 1995) han estudiado la composición de los *biofilms* peri-implantarios y los factores que influyen en su formación, destacando:

- La presencia de dientes naturales y su estado periodontal, que condiciona una fuente de patógenos para colonizar las superficies implantaria (Quirynen et al. 1996). Los

pacientes con dientes remanentes, frente a los edéntulos completos (van Winkelhoff et al. 2000), y los pacientes con periodontitis no tratada, frente a los pacientes con el periodonto sano (van Winkelhoff et al. 2008), tendrán más riesgo de que sus biofilms peri-implantarios sean colonizados por patógenos periodontales.

- El tiempo de exposición en la cavidad oral. El impacto del tiempo de exposición en la cavidad oral sobre la composición de la microbiotasubgingival alrededor de implantes es diferente en pacientes desdentados parciales y totales (Quirynen et al. 2006), con mayor presencia y colonización más rápida de patógenos periodontales en sujetos parcialmente edéntulos y con periodontitis.
- Ajuste pasivo de los componentes de los implantes. La discrepancia (denominada “gap”) entre los diferentes componentes de los implantes (sobre todo los ubicados subgingivalmente), ofrecen un medio ideal para la formación de nuevo de *biofilm*, así como para dificultar su eliminación. El “gap” entre el implante propiamente dicho y los componentes protésicos se ha estimado entre 1-10 y 49 μm (Binon et al. 1992; Jansen et al. 1997), discrepancias que permiten la colonización bacteriana.
- La higiene oral parece influir de manera evidente en la composición de la microbiota peri-implantaria. Se señala además que la higiene oral del paciente tiene un impacto significativo en la estabilidad del hueso marginal alrededor de los implantes, especialmente en fumadores (Lindquist et al. 1998).
- El micro medioambiente alrededor del implante puede favorecer el desarrollo de gérmenes anaerobios Gram-negativos y la accesibilidad de nutrientes y condiciones físico-químicas favorables. Esto ocurre en casos en que la anatomía y la colocación del implantes han favorecido al formación de bolsas peri-implantarias.
- La superficie del implante, que favorezca la adhesión y la formación de *biofilms* (Quirynen & Bollen 1995). La rugosidad de la superficie no solo favorece la adhesión

y acumulación bacteriana, sino que aumenta el área disponible para la adhesión en casi tres veces.

El material más utilizado para la fabricación de implantes es el titanio, especialmente por sus propiedades de bio-compatibilidad, su capacidad de óseo-integración, sus propiedades mecánicas. En los últimos años las características microscópicas de las superficies de los implantes dentales han experimentado una importante evolución (rugosidad, composición química, hidrofobicidad, etc.) con el objetivo de favorecer la osteopromoción y así alcanzar un área mayor de contacto hueso-implante, acelerando de este modo los tiempos de tratamiento (Wennerberget al. 2010). No obstante, estas mismas características han demostrado en estudios experimentales que pueden favorecer la colonización de bacterias procedentes del *biofilm* subgingival . Igualmente, se esta trabajando en la elaboración de materiales alternativos al titanio, como los materiales cerámicos (hidroxiapatita) o el zirconio, con similares propiedades físicas, pero con mejor afinidad química al hueso y mayor resistencia a la adherencia bacteriana (Wennerberget al. 2010).

Los estudios de la población microbiana alrededor de los implantes dentales han mostrado que, cuando las bacterias colonizan el espacio peri-implantario justo después de la colocación del implante, las especies dominantes son miembros del género *Streptococcus* y miembros del complejo amarillo y púrpura, destacando diferentes especies del género *Actinomyces*, con el subsiguiente desarrollo en la zona una comunidad multi-microbiana (Quirynen et al. 2006;Kumar et al. 2012). Como ocurre en los dientes naturales, los microorganismos asociados a superficies de implantes en estado de salud son predominantemente cocos y bacilos Gram positivos (Lee & Wang 2010) Sin embargo, cuando el *biofilm* madura, miembros de los complejos verde, naranja y rojo colonizarán la zona (Quirynen et al. 2006; Do Nascimento et al. 2013) y aparecerá la situación clínica

asociada al fracaso de implantes o enfermedad peri-implantaria(Kumar et al. 2012;Shibli et al. 2008;Tabanella et al. 2009).

Aún hoy en día existe mucha controversia en cuanto a cómo las características de la superficie del material del implante puede afectar la colonización bacteriana y la subsiguiente formación del *biofilm*. En un trabajo previo, estudiamos la respuesta de los *biofilms* bacterianos *in vitro* a diferentes superficies implantables, titanio y zirconio, en cuanto a su estructura tridimensional alcanzada y la dinámica de maduración. Se pudo comprobar que si bien la dinámica bacteriana de incorporación al *biofilm*, así como la maduración no presentaban diferencias significativas, sí se observaba diferencia en la arquitectura tridimensional de los mismos (Figura 1). Por ello, nos propusimos estudiar si el efecto de diferentes agentes antibacterianos podría ser distinto sobre ambos *biofilms*, de diferente estructura.

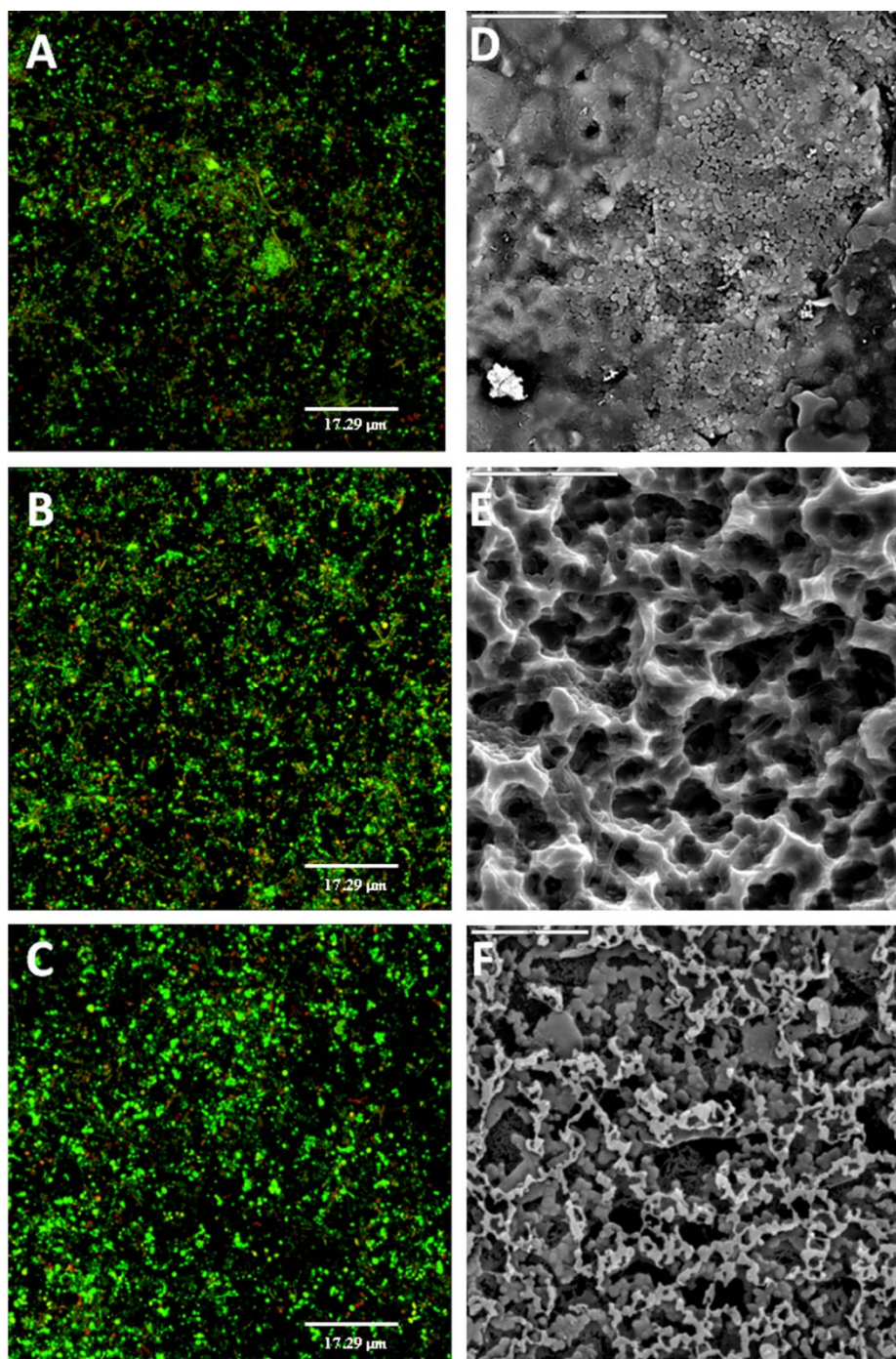


Figura 1. Máxima proyección obtenida por Microscopía Laser Confocal(A, B y C) y por Microscopía Electrónica de Barrido a bajas Temperaturas (D, E y F) de los *biofilms* en: (A,D) hidroxiapatita (B,E) titanioy (C,F) zirconio después de 72 h of incubación. Se pueden apreciar las diferencias en la arquitectura de los *biofilms* en los distintos materiales: los *biofilms* en hidroxiapatita (A,D) cubren la superficie del disco con capas homogéneas de bacterias combinadas con grandes colonias en torres y espacios intersticiales huecos; Los *biofilms* en titanio (B,E) adquieren una estructura crateriforme rica en matriz extracelular; Sobre la superficie de zirconio (C,F) los *biofilms* aparecen como redes con colonias de bacterias interconectadas, con una matriz extracelular similar a una tela de araña que conecta y rodea todas las bacterias.

En el presente trabajo, se han utilizado dos de las superficies más utilizadas actualmente como material de implante, la superficie de titanio puro de rugosidad intermedia obtenida por grabado ácido [discos de 5 mm de diámetro (Institut Straumann AG, Basel, Suiza)] y la superficie cerámica de zirconio [discos de 5 mm de diámetro (Institut Straumann AG)].

Las características y propiedades de estos materiales se detallan a continuación:

- **Titanio:** elemento químico de símbolo Ti y número atómico 22. Se trata de un metal de transición de color gris plata. Comparado con el acero, aleación con la que compite en aplicaciones técnicas, es mucho más ligero. Está situado en el grupo 4B de la tabla periódica.

La elección del titanio se debe a que este metal en contacto con la atmósfera se oxida en milisegundos transformándose su superficie en óxido de titanio. Dicho óxido se comporta como un material bio-inerte, es decir que no produce rechazo, reacción natural del organismo ante la presencia de un cuerpo extraño que deriva habitualmente en complicaciones clínicas. Además, el titanio presenta unas características mecánicas muy adecuadas, ya que su dureza permite soportar cargas oclusales elevadas, y su módulo elástico es muy parecido al del hueso. Actualmente los implantes dentales son menos propensos a ser de titanio puro debido al descubrimiento de que las aleaciones de titanio funcionan igual.

- **Zirconio:** elemento químico de número atómico 40. Se trata de un metal de transición, situado en el grupo 4B de la tabla periódica. Su símbolo es Zr. Actualmente, algunos profesionales, prefieren usar el zirconio, al tratarse de un material cerámico, tanto en los implantes dentales como en el resto de componentes protésicos. Se trata de un material que presenta también muy buenos resultados de cara a la osteointegración, y que

además añade una ventaja estética, ya que el color de los componentes del implante es de acuerdo con la color natural del diente.

La base del tratamiento de la gingivitis, así como de la prevención de la periodontitis se basa en la eliminación mecánica de los *biofilms* causantes (profilaxis profesional) y la prevención de su acumulación mediante una higiene adecuada. Ambos enfoques, preventivo y terapéutico, pueden ser suplementados mediante el control químico del *biofilm*, normalmente mediante el uso de agentes antisépticos. Dicho enfoque preventivo y terapéutico se ha aplicado de un modo similar al tratamiento de las mucositis peri-implantarias y peri-implantitis.

Los tratamientos seleccionados para evaluar la respuesta de las bacterias organizadas en *biofilm* en ambas superficies de implantes fueron:

- **Colutorios con Clorhexidina (CHX) y Cloruro de Cetil Piridinio (CPC) como principio activo antibacteriano**

El digluconato de CHX es un agente antimicrobiano tópico que se utiliza para enjuagues bucales en el tratamiento y prevención de las enfermedades periodontales, y tópicamente en la preparación de la piel del paciente antes de una operación quirúrgica, lavado de heridas, o tratamiento del acné vulgar. Otros usos de la CHX incluyen la profilaxis y el tratamiento de las infecciones de boca, la estomatitis, la estomatitis ulcerativa y la gingivitis necrotizante. Los enjuagues de CHX se utilizan también para tratar y prevenir las mucositis en los pacientes tratados con fármacos anticancerosos. La CHX incorpora también a una serie de instrumentos médicos, como catéteres intravenosos, vendajes antimicrobianos e implantes dentales. El espectro antibacteriano de la CHX incluye tanto a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, algunos virus como el VIH y algunos hongos, pero sólo es esporádica a elevadas temperaturas. La actividad antiséptica de la CHX es superior a la de la povidona,

la espuma de alcohol y el hexaclorofeno. La CHX es un antiséptico tópico ideal, debido a su persistente actividad sobre la piel con el uso continuo, un efecto muy rápido y una mínima absorción, aunque se han asociado algunas reacciones alérgicas al tratamiento tópico con CHX.

Mecanismo de acción: la CHX desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas. La CHX precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular. En las bacterias Gram-negativas, la CHX afecta la membrana exterior permitiendo la liberación de las enzimas periplasmáticas. La membrana interna de estos microorganismos no es destruida, pero sí que es impedida la absorción de pequeñas moléculas. A bajas concentraciones, la CHX exhibe un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida. Los siguientes microorganismos muestran una alta susceptibilidad a la CHX: el género *Streptococcus*, el género *Staphylococcus*, *Candidaalbicans*, *Escherichiacoli*, el género *Salmonella*, y amplio número de bacterias anaeróbicas. Sin embargo, las cepas de *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y cocos Gram-negativos muestran una baja susceptibilidad a la CHX. Los estudios clínicos han demostrado que no hay un aumento significativo de la resistencia bacteriana ni desarrollo de infecciones oportunistas durante el tratamiento a largo plazo con CHX (VADEMECUM, 2013).

- ***Colutorios con aceites esenciales y base alcohólica como principio activo antibacteriano.***

Listerine® es un enjuague bucal antiséptico, patentado por de Johnson & Johnson, originario de EE.UU., y se comercializa en todo el mundo. Fue nombrado así en honor a Joseph Lister,

que contribuyó a reducir en gran medida el número de muertes por infecciones contraídas en el quirófano después de que los pacientes fueran sometidos a intervenciones quirúrgicas.

Listerine® es uno de los enjuagues bucales más populares en Estados Unidos. Originalmente comercializado por la Sociedad Lambert Pharmacal que más tarde se convirtió en Pfizer, actualmente es fabricado y distribuido por Johnson & Johnson desde la adquisición de esa compañía de la división de Pfizer ConsumerHealthCarea finales de diciembre de 2006.

Mecanismo de acción:

LISTERINE®, gracias a su fórmula de cuatro aceites esenciales (Timol, Eucaliptol, Salicilato de Metilo y Mentol) diluidos en la cantidad necesaria de alcohol farmacéutico, para disolver la fase grasosa de los aceites, penetra profundamente en el *biofilm*, produciendo una alteración cualitativa y cuantitativa de los microorganismos en su interior.

Los aceites esenciales, compuestos orgánicos con constituyentes distintos extraídos de vegetales por procesos específicos, son sustancias extraídas de plantas aromáticas empleadas en la industria cosmética, farmacéutica y de perfumes. Pueden estar presentes en diferentes partes de las plantas (hojas, flores, corteza, madera, ramas, frutos, rizomas). Estas sustancias en las concentraciones encontradas en **LISTERINE®** brindan beneficios refrescantes y antibacterianos. El uso del alcohol es necesario para solubilizar y disolver los aceites esenciales y así puedan penetrar más profundamente el *biofilm*. Ningún otro ingrediente ha demostrado ser más eficaz que los aceites esenciales para penetrar las paredes celulares bacterianas.

3. OBETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVOS

Nos proponemos como objetivo principal evaluar la respuesta de las bacterias orales incluidas en *biofilms* maduros de 72 h, generados en un modelo de biofilm oral *in vitro*, sobre distintas superficies de implantes (titanio y zirconio), frente a diferentes agentes antibacterianos (colutorio de aceites esenciales, colutorio con CHX y CPC).

HIPÓTESIS

Los tratamientos antisépticos eliminan las bacterias del *biofilm*, impidiendo el desarrollo de infecciones. La respuesta bacteriana a ellos podría estar condicionada por la arquitectura tridimensional del *biofilm* en el que habitan.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

La formación de un *biofilm* con bacterias orales sobre distintas superficies de implantes se ha realizado seleccionando bacterias que representan a los colonizadores primarios (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*), y tardíos (*A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*). Las cepas utilizadas y las colecciones de cultivo tipo a la que pertenecen se muestran en la Tabla 1. Las cepas se mantienen crio- conservadas a -80°C.

Tabla 1. Cepas seleccionadas en el estudio y colección de cultivo tipo

Cepa	Referencia
<i>Fusobacteriumnucleatum</i>	DSMZ ¹ 20482
<i>Aggregatibacteractinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324
<i>Veillonellaparvula</i>	NCTC ² 11810
<i>Actinomycesnaeslundii</i>	ATCC ³ 19039
<i>Porphyromonasgingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Streptococcusoralis</i>	CECT ⁴ 907T

¹DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen

²NCTC, National Collection of Type Cultures

³ATCC, American Type Cultures Collection

⁴CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Las bacterias se cultivaron en placas de medio Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra), suplementado con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaeróbicas (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C entre 24- 72h.

4.2 Superficies seleccionadas

Se utilizaron dos superficies, discos de titanio grado 2, superficie SLA de 5 mm de diámetro (Straumann; Instituto Straumann AG, Basel, Suiza) y discos de zirconio ZrO_2 de 5mm de diámetro (Straumann; Instituto Straumann AG, Basel, Suiza).

4.3 Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas

Con el fin de estandarizar las condiciones del estudio e inocular una concentración constante de cada una de las cepas en todos los ensayos, favoreciendo así la reproducibilidad del modelo, se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria, que fueron realizadas con anterioridad, para el desarrollo del modelo de *biofilm* estático (Sánchez et al. 2011). Estas curvas permitieron relacionar con facilidad los datos de densidad óptica (D.O), tiempo de generación y unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro (UFC/mL).

Los ensayos se han realizado en 100 mL del medio denominado BHI2, que consiste en medio BHI [medio BrainHeartInfusion (Becton, Dickinson and Company; EE.UU.)], suplementado con:

- Mucina (2,5 g/L)
- Extracto de levadura (1,0 g/L)
- Cisteína (0,1 g/L)
- Bicarbonato sódico (2,0 g/L)
- Hemina (5 mg/L), Menadiona (1 mg/L)
- 0,25% de ácido glutámico (v/v)]

Se preparó un preinóculo a partir de una colonia de un cultivo fresco en placas de medio Agar Sangre suplementado, que se inculó en 15 mL de medio BHI2, incubándolo en anaerobiosis a 37°C, durante 24-72h en función de la especie bacteriana. Entre 100-300 μ L

del preinóculo se adicionó a 100 mL de medio BHI2 fresco, para comenzar la curva en la fase “lag” o de aclimatación (aproximadamente 0,05 de D.O).

A determinados intervalos de tiempo, en función de la especie bacteriana, se fueron realizando medidas de la D.O a 550 nm. Las medidas de la densidad óptica se realizaron en un espectrofotómetro, previamente calibrado con dos cubetas de medio BHI2, para posteriormente introducir 1 mL de cada una de las bacterias en sus respectivas cubetas y medir su densidad óptica, siempre dejando uno de los controles en el equipo.

De esta manera se relacionaron el tiempo de crecimiento, la medida de D.O. y las UFC/mL correspondientes.

Las curvas de crecimiento confirmadas en el presente trabajo se muestran en la Figura 2.

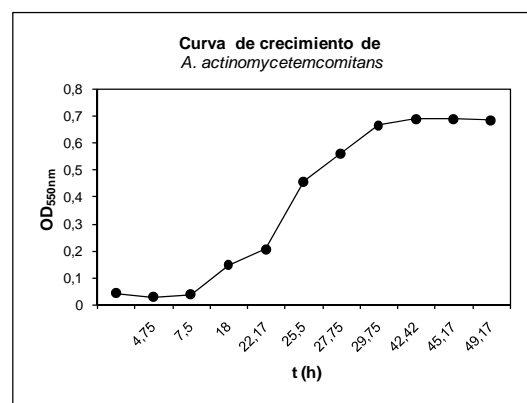
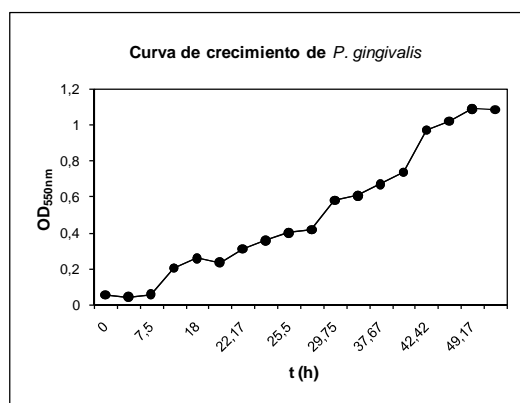
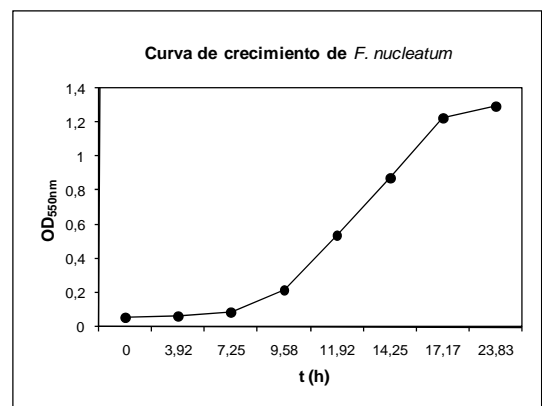
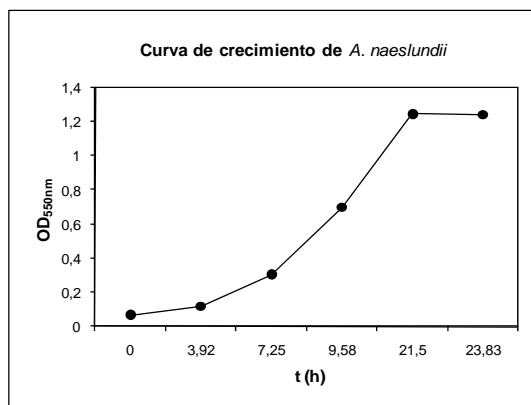
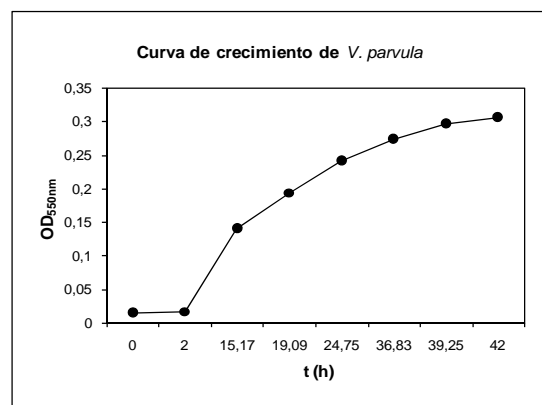
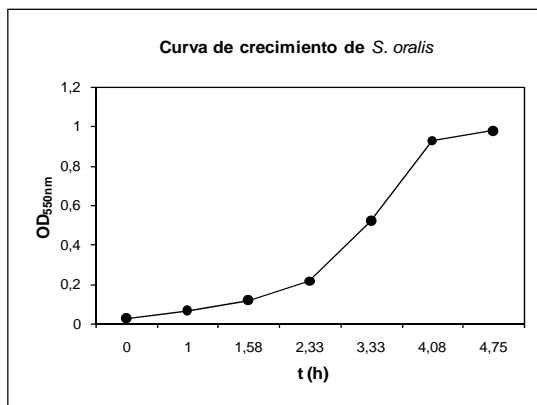


Figura 2. Curvas de crecimiento de las especies bacterianas utilizadas en los ensayos

4.4 Formación del *biofilm* en las superficies seleccionadas

Una vez conocidas las curvas de crecimiento se procedió a la generación del *biofilm* sobre las diferentes superficies seleccionadas.

Una única colonia de cada aislado se inoculó en 15 mL de medio BHI2, que se incubó en anaerobiosis a 37°C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento en cada uno de ellos, que se comprobó con la medida espectrofotométrica de la D.O a 550nm. A partir de los preinóculos de las seis especies utilizadas, se preparó un solo inóculo de 10 mL, conteniendo las 6 especies bacterianas, a un valor de UFC/mL final previamente determinado y que se mantuvo constante en todos los ensayos a fin de favorecer la reproducibilidad del modelo (Tabla 2).

Se ajustó la densidad óptica por dilución en el medio BHI2 fresco hasta los valores estipulados en el estudio. Estos valores vienen determinados por el tiempo de generación de cada bacteria, corroborado en las curvas de crecimiento (Figura 2).

Tabla 2.- Cepas seleccionadas en el estudio y concentración final (ufc/mL) en el preinóculo

Cepa	Concentración final (ufc/mL)
<i>Fusobacteriumnucleatum</i>	10 ⁶
<i>Aggregatibacteractinomycetemcomitans</i>	10 ⁶
<i>Veillonellaparvula</i>	10 ⁵
<i>Actinomycesnaeslundii</i>	10 ⁵
<i>Porphyromonasgingivalis</i>	10 ⁶
<i>Streptococcusoralis</i>	10 ³

Los discos se introdujeron en placas estériles de cultivo celular de 24 pocillos (GreinerBio-one, Frickenhausen, Alemania), tres discos de cada material, vertiendo en cada pocillo con

disco 1500 µl del inóculo preparado. En dos pocillos vacíos se pusieron controles de medio BHI2 para confirmar la esterilidad del medio así como del proceso de manipulación e incubación. Durante todo el ensayo se ha trabajado en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. El desarrollo del *biofilm* se llevó a cabo en anaerobiosis, a 37°C durante 72 horas. Transcurrido el tiempo estipulado de generación, los discos son retirados del sistema en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar para su posterior tratamiento.

4.5. Colutorios utilizados

Se utilizaron los siguientes colutorios disponibles comercialmente: PerioAidtratamiento® (Dentaid, Cerdanyola, España) que contiene 0,12% CHX y 0,05% CPC como principios activos, sin alcohol (CHX/CPC), y Listerine® (Johnson & Johnson, Madrid, España) que contiene una mezcla de aceites esenciales (EO) como principio activo, (timol 0,06%, eucalipto 0,09%, metil salicilato 0,06%, y mentol 0,01%) en solución alcohólica. El buffer fosfato salino (PBS) ha sido utilizado como control positivo.

4.6. Exposición a los colutorios

Tras 72 horas de incubación, los discos fueron lavados tres veces en 2 mLde PBS estéril, durante 10 segundos por lavado, para retirar las bacterias no adheridas. Para evaluar la respuesta de los *biofilm* generados sobre las diferentes superficies, se dispusieron 2 mLde cada uno de los colutorios, así como del control positivo PBS, en una placa multipocillo, sometiendo a los *biofilms* a su acción durante 1 minuto por inmersión. Tras la exposición al colutorio, los discos se lavaron tres veces consecutivas en 2 mLde PBS durante 10 segundos, para retirar posibles restos de producto.

En cada ensayo, los dos colutorios y el control fueron tratados simultáneamente. Los experimentos se repitieron en tres ocasiones, con tríos de *biofilm* por cada material.

4.7. Análisis de la viabilidad bacteriana mediante técnica de cultivo

Después de realizar el tratamiento, se disgregan los biofilms en 1 mL de PBS por vortex, agitando durante 3 minutos. Una vez disgregado el biofilm se realizan las diluciones seriadas necesarias de cada muestra en PBS para un correcto recuento de las bacterias viables. Cien μL de cada muestra se sembraron, por duplicado, mediante el método de dilución en placa, en medio Agar sangre suplementado. Las placas se incuban en anaerobiosis y a 37°C durante 7 días para identificar correctamente la morfología de cada una de las especies bacterianas. Para llevar a cabo un recuento correcto, se seleccionaron las placas que contuvieran entre 30 y UFC/mL.

4.8. Análisis estadístico de los datos

Los datos para la variable estudiada, vitalidad celular, fueron calculados como UFC/mL, y transformados en logaritmo para obtener una distribución normal. Se ha realizado un análisis a nivel de experimento para cada parámetro de estudio ($n = 3$). Para cada material, se comparó el número de bacterias, entre aceites esenciales y PBS, y entre CHX+CPC y PBS mediante test t de Student independiente. Por otro lado, las proporciones relativas (bacterias con cada producto activo en relación con las bacterias en PBS), se compararon entre materiales mediante t de Student pareada. Se han utilizado Box-plots para la presentación gráfica de los datos. Los resultados se han considerado estadísticamente significativas a $p < 0,05$. Se ha utilizado el software Stagraphics 5.1 (STATPOINT TECHNOLOGIES, INC., Warrenton, Virginia, EE.UU.) para todos los análisis de datos.

5. RESULTADOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos del recuento de bacterias viables por cultivo en los *biofilms* generados sobre el material de zirconio y titanio, tratados con PBS como control positivo y con los agentes antisépticos seleccionados en el estudio, expresados como media y desviación estándar del logaritmo de las UFC/mL en la Tabla 3.

Tabla 3. Logaritmo del número de bacterias viables de cada una de las especies bacterianas incluidas en los *biofilms* maduros de 72 h de formación (log UFC/mL), mediante la técnica de cultivo, tras la exposición a la solución control Buffer fosfato salino (PBS) y los principios activos formulados como colutorios: 0,12% CHX y 0,05% CPC (CHX/CPC) y mezcla de aceites esenciales (EO).

Superficie	Trata- miento	Especie bacteriana					
		Número de bacterias log UFC/mL (Media (Desviación estándar))					
		<i>So</i>	<i>Vp</i>	<i>An</i>	<i>Fn</i>	<i>Pg</i>	<i>Aa</i>
TITANIO	PBS	6,4 (0,3)	6,5 (0,9)	5,3 (0,1)	4,6 (0,5)	6,0 (0,5)	7,1 (0,5)
	EO	5,4 (0,4)	6,7 (0,3)	5,1 (0,2)	5,7 (1,1)	4,6 (1,1)	6,2 (0,7)
	CHX/CPC	5,7 (0,4)	6,7 (0,4)	5,2 (0,1)	5,5 (0,1)	5,9 (0,8)	6,6 (0,9)
ZIRCONIO	PBS	6,4 (0,1)	6,9 (0,4)	5,3 (0,2)	5,3 (0,3)	5,7 (0,3)	6,7 (0,6)
	EO	5,4 (0,4)	6,6 (0,4)	4,7 (0,1)	4,5 (1,3)	4,5 (0,8)	6,5 (0,2)
	CHX/CPC	5,7 (0,2)	6,6 (0,1)	5,0 (0,4)	5,1 (0,2)	5,2 (0,3)	6,4 (0,3)

So: *Streptococcus oralis*; *An:* *Actinomyces naeslundii*; *Vp:* *Veillonella parvula*; *Fn:* *Fusobacterium nucleatum*; *Pg:* *Porphyromonas gingivalis*; *Aa:* *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

5.1. Efecto *in vitro* de la formulación antiséptica con aceites esenciales como principio activo (Listerine®) en los *biofilms* bacterianos sobre la superficie de zirconio.

Observando los datos recogidos en la Tabla 3, se puede observar un descenso en el número de bacterias de todas las especies incluidas en los *biofilms*, al comparar los recuentos obtenidos tras la exposición de los *biofilms* a la solución control y en este caso al antiséptico basado en la mezcla de Aceites Esenciales. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$), excepto para *A. naeslundii* ($p = 0,006$). La Figura 3 muestra la representación en Box-plot del logaritmo de las UFC/mL de las seis especies bacterianas en los *biofilms* sobre zirconio, tratados con PBS como control positivo y con el colutorio Listerine®.

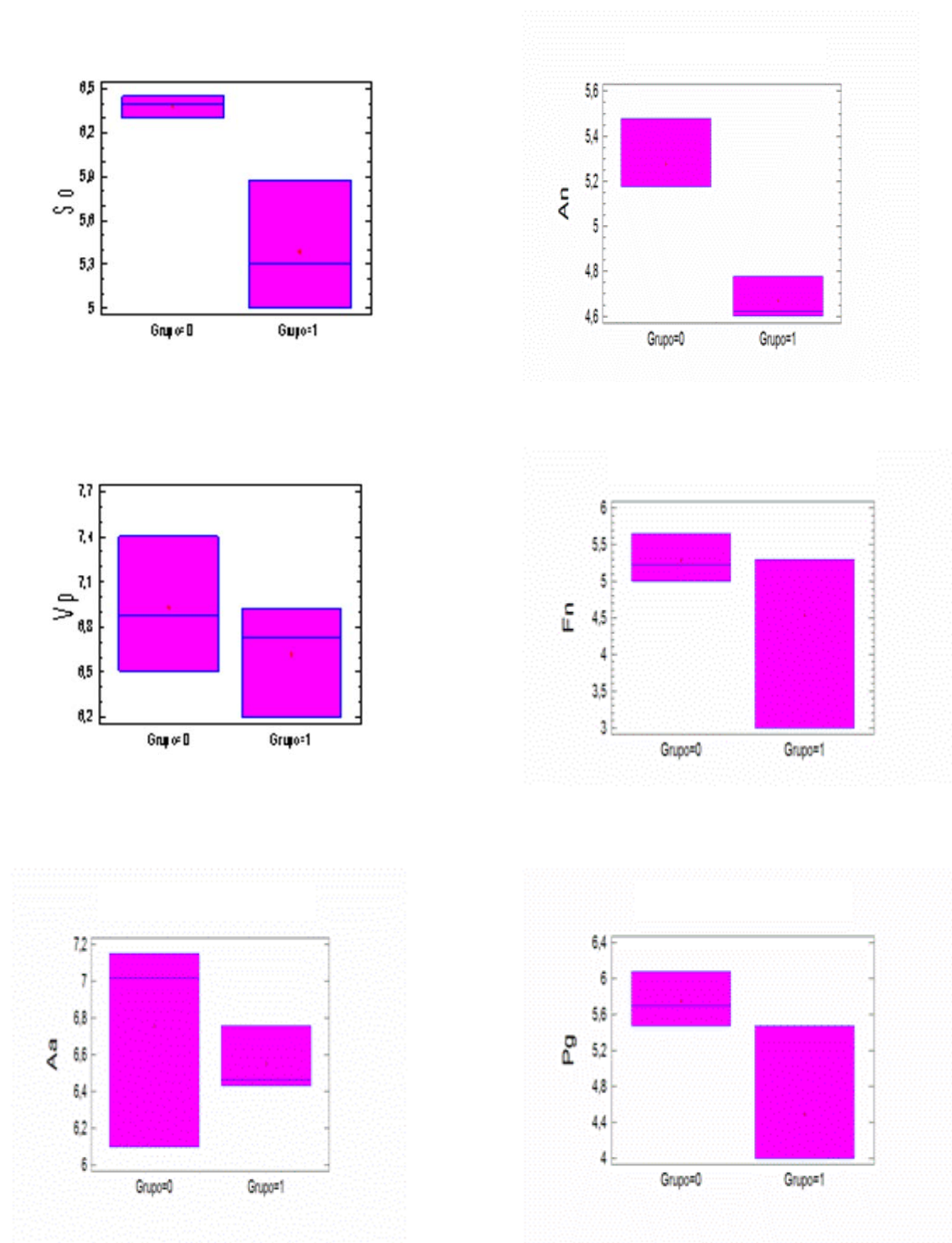


FIGURA 3. Representación gráfica en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las 6 especies bacterianas que participaron en el *biofilm*, generado sobre zirconio: Grupo (0), grupo control tratado con PBS; Grupo (1), grupo tratado con el antiséptico Listerine®. So: *Streptococcus oralis*; An: *Actinomyces naeslundii*; Vp: *Veillonella parvula*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*.

5.2.Efecto *in vitro* de la formulación antiséptica con aceites esenciales como principio activo (Listerine®) en los *biofilms* bacterianos sobre la superficie de titanio.

A continuación se muestran los gráficos en Box-Plot (Figura 4) del logaritmo de las UFC/mL de las seis especies bacterianas en el *biofilm* sobre titanio, tratadas con PBS como control positivo y con el colutorio Listerine®.

Los datos recogidos en la Tabla 3 muestran un descenso en la mayoría de los casos en el número de bacterias viables tras la exposición de los *biofilms* al colutorio cuando se comparan con los *biofilms* expuestos a la solución de PBS. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los casos.

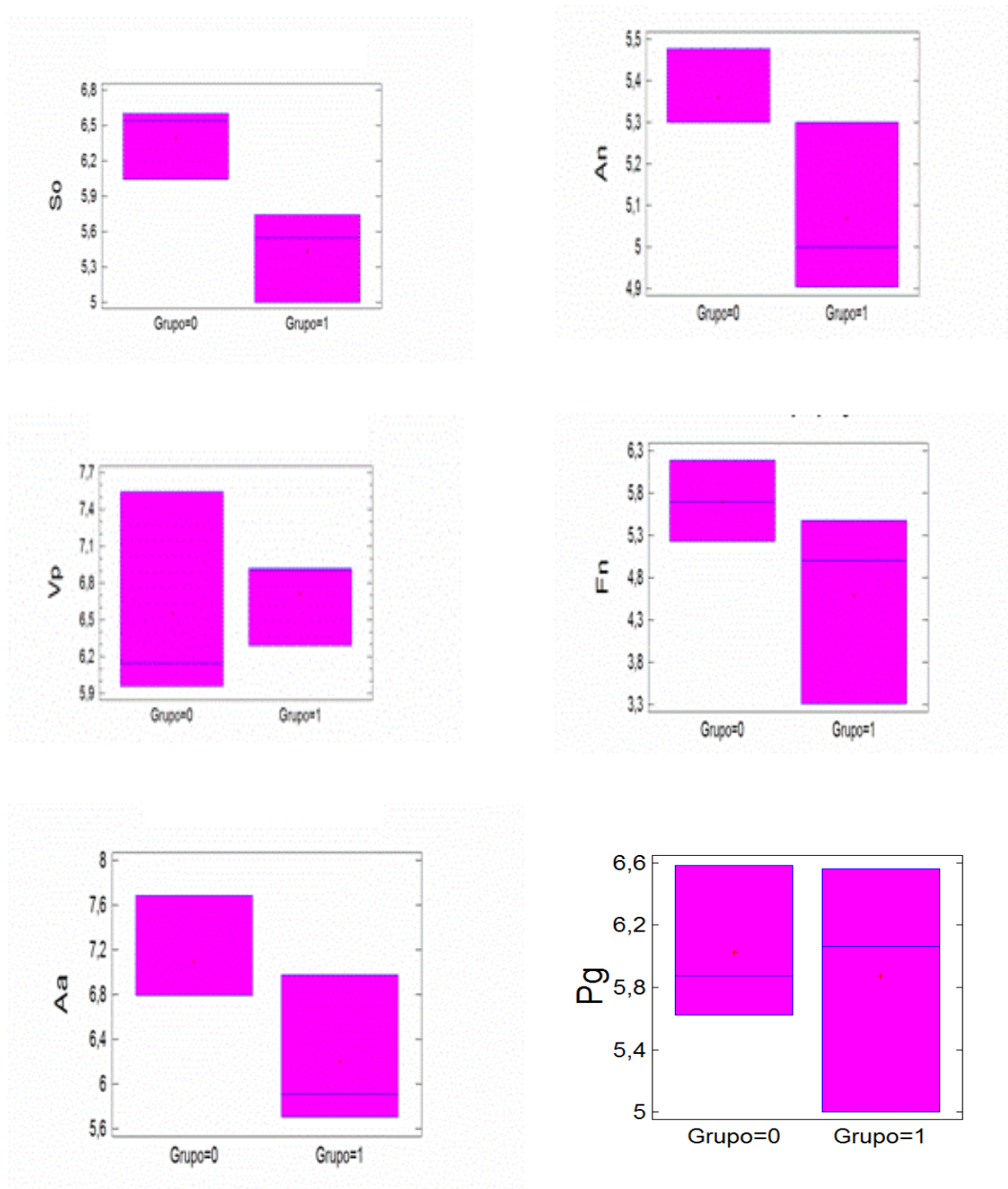


FIGURA 4. Representación gráfica en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las 6 especies bacterianas que participaron en el *biofilm*, generado sobre titanio: Grupo (0), grupo control tratado con PBS; Grupo (1), grupo tratado con el antiséptico Listerine®. So: *Streptococcus oralis*; An: *Actinomyces naeslundii*; Vp: *Veillonella parvula*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*.

5.3 Comparativa del efecto antiséptico de las formulaciones con Aceites Esenciales (Listerine®) en los *biofilms* generados sobre las superficies de zirconio y titanio.

La Figura 5 muestra la representación en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las seis especies bacterianas en el *biofilm* sobre titanio y zirconio, para llevar a cabo la comparación del efecto antiséptico de las formulaciones con Aceites Esenciales (Listerine®) sobre las bacterias organizadas en comunidad en la superficie en ambos materiales. No se observan diferencias estadísticamente significativas del efecto del colutorio para las bacterias incluidas en los *biofilms* al comparar su efecto en ambos materiales ($p > 0,05$), excepto en el caso de la especie *A. naeslundii* ($p = 0,031$), que se formó significativamente menos en los *biofilms* tratados con aceites esenciales sobre zirconio.

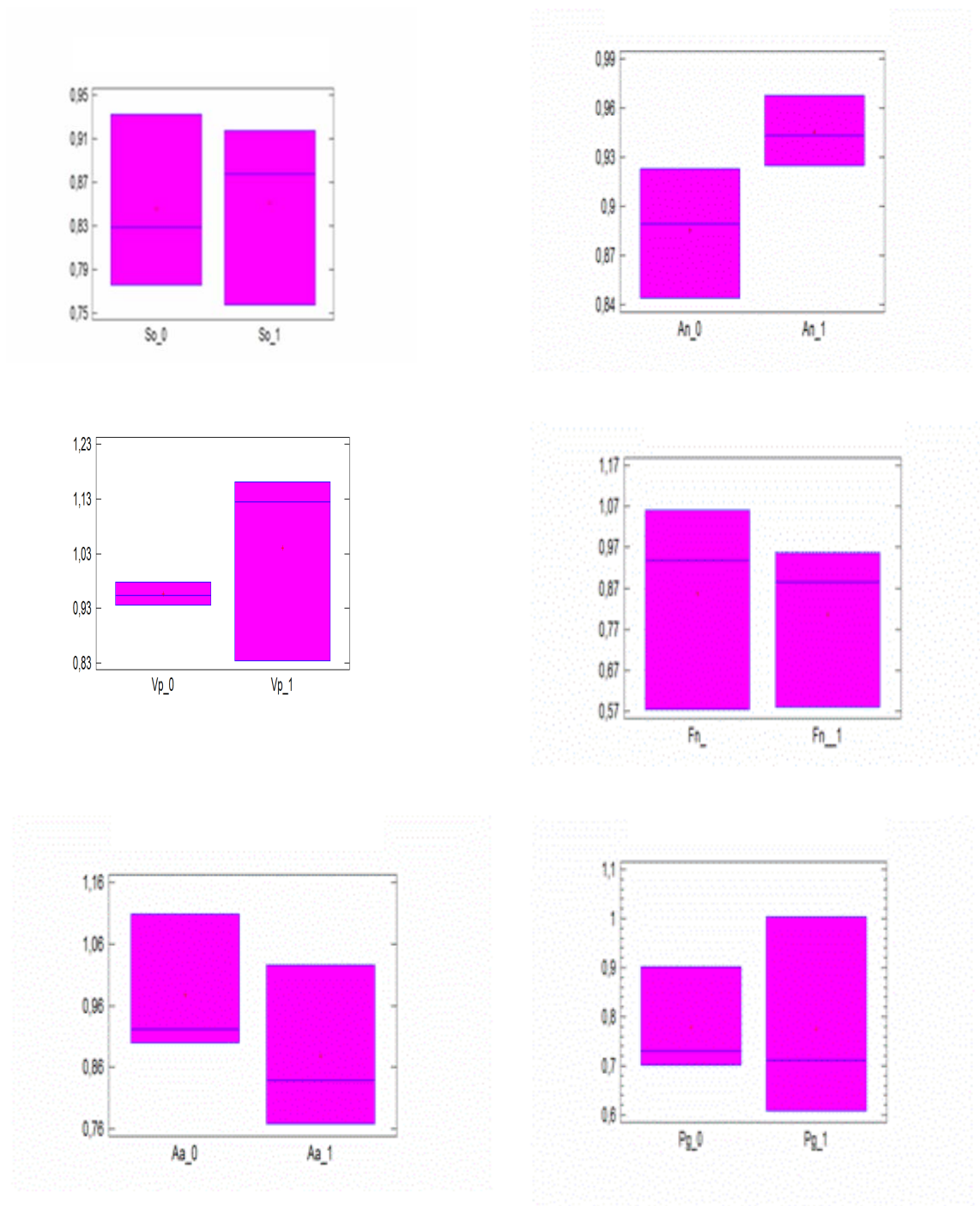


FIGURA 5. Representación gráfica en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las 6 especies bacterianas que participaron en el *biofilm*, generado sobre zirconio [Grupo (0)] y titanio [Grupo (1)], tratados con el antiséptico Listerine®. So: *Streptococcus oralis*; An: *Actinomyces naeslundii*; Vp: *Veillonella parvula*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*.

5.4. Efecto *in vitro* de la formulación antiséptica con CHX y CPC en los *biofilms* bacterianos sobre la superficie de zirconio.

La Figura 6 muestra la representación en Box-plot del logaritmo de las UFC/mL de las seis especies bacterianas en el *biofilm* sobre zirconio, tratadas con PBS como control positivo y con el colutorio con CHX y CPC.

Observando los datos recogidos en la Tabla 3, se puede observar un descenso en el número de bacterias en todas las especies incluidas en los *biofilms*, al comparar los recuentos obtenidos tras la exposición de los *biofilms* a la solución control y en este caso al antiséptico basado en CHX y CPC. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$), excepto para *S. oralis* ($p = 0,003$).

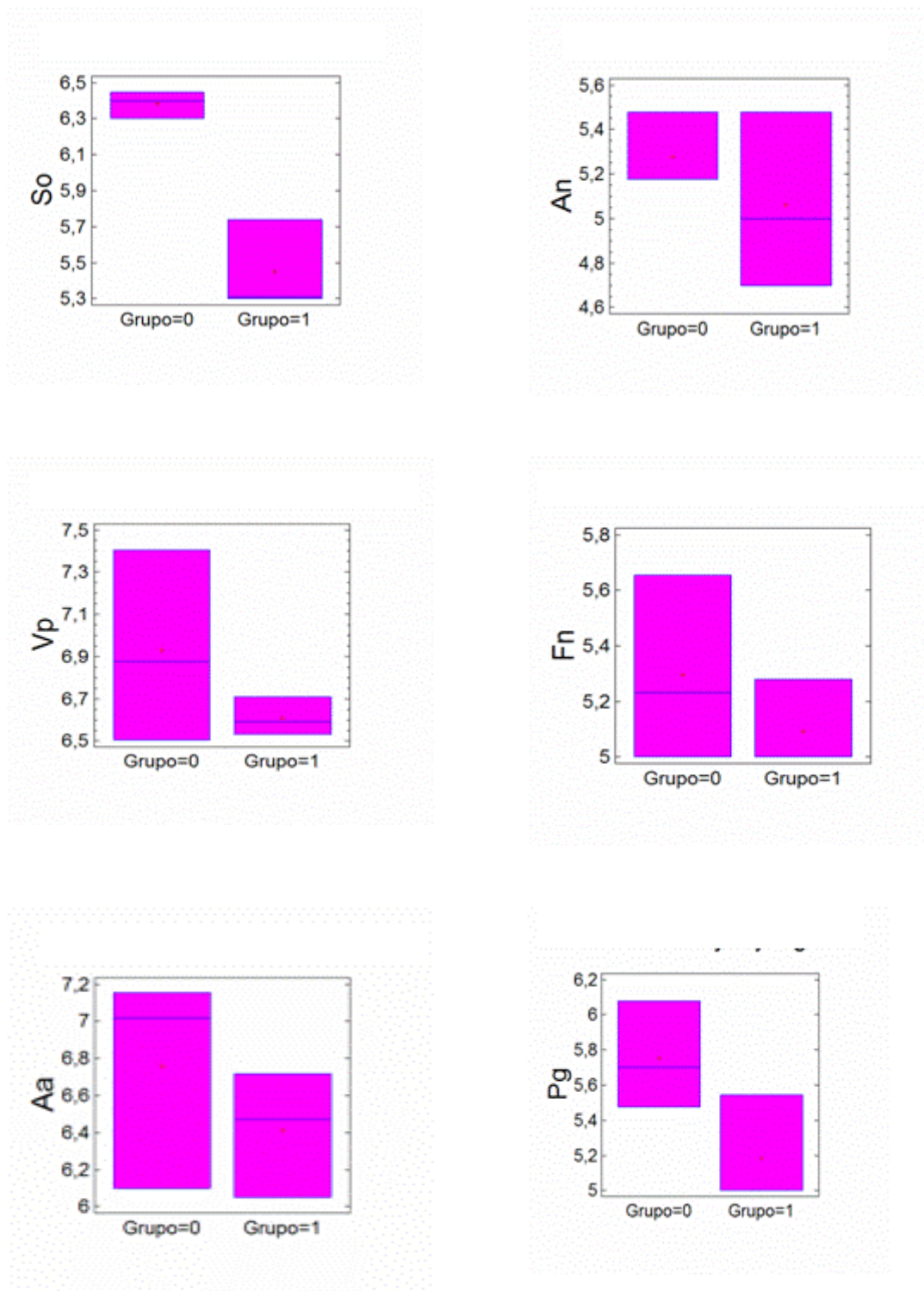


FIGURA 6. Representación gráfica en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las 6 especies bacterianas que participaron en el *biofilm*, generado sobre zirconio: Grupo (0), grupo control tratado con PBS; Grupo (1), grupo tratado con el antiséptico Perioaid. So: *Streptococcus oralis*; An: *Actinomyces naeslundii*; Vp: *Veillonella parvula*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*.

5.5. Efecto *in vitro* de la formulación antiséptica con CHX y CPC en los *biofilms* bacterianos sobre la superficie de titanio.

A continuación se muestran los gráficos en Box-Plot (Figura 7) del logaritmo de las UFC/mL de las seis especies bacterianas en el *biofilm* sobre titanio, tratadas con PBS como control positivo y con el colutorio con CHX y CPC.

Los datos recogidos en la Tabla 3 muestran un descenso en la mayoría de los casos en el número de bacterias viables tras la exposición de los *biofilms* al colutorio cuando se comparan con los *biofilms* expuestos a la solución de PBS. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los casos.

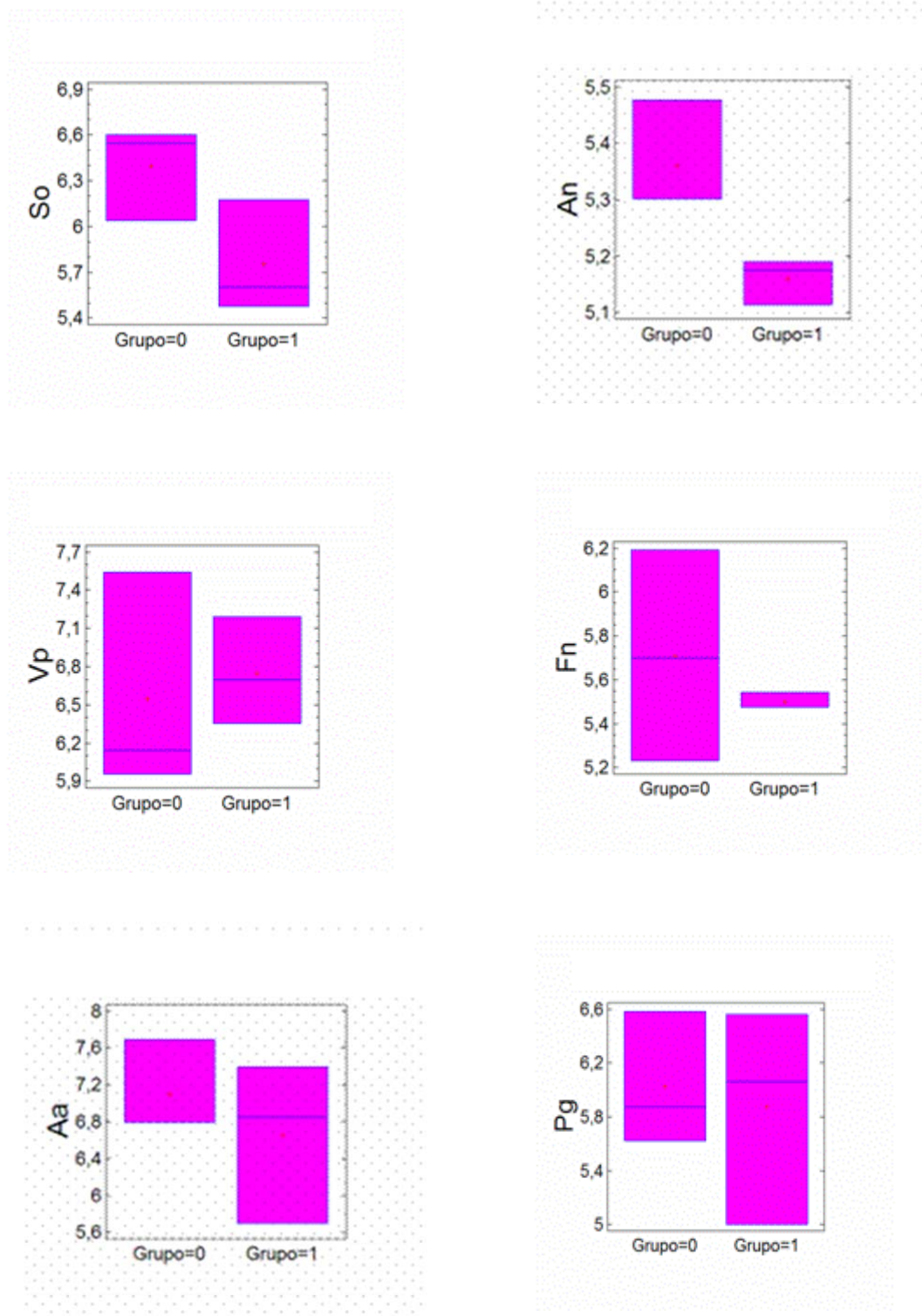


FIGURA 7. Representación gráfica en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las 6 especies bacterianas que participaron en el *biofilm*, generado sobre titanio: Grupo (0), grupo control tratado con PBS; Grupo (1), grupo tratado con el antiséptico Perioaid®. So: *Streptococcus oralis*; An: *Actinomyces naeslundii*; Vp: *Veillonella parvula*; Fn: *Fusobacterium nucleatum*; Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg: *Porphyromonas gingivalis*.

5.6 Comparativa del efecto antiséptico de las formulaciones de CHX y CPC en los *biofilms* generados sobre las superficies de zirconio y titanio.

La Figura 8 muestra la representación en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las seis especies bacterianas en el *biofilm* sobre titanio y zirconio, para llevar a cabo la comparación del efecto antiséptico de las formulaciones con CHX y CPC en las bacterias organizadas en comunidad en la superficie en ambos materiales. No se observan diferencias estadísticamente significativas del efecto del colutorio para las bacterias incluidas en los *biofilms* al comparar su efecto en ambos materiales ($p > 0,05$).

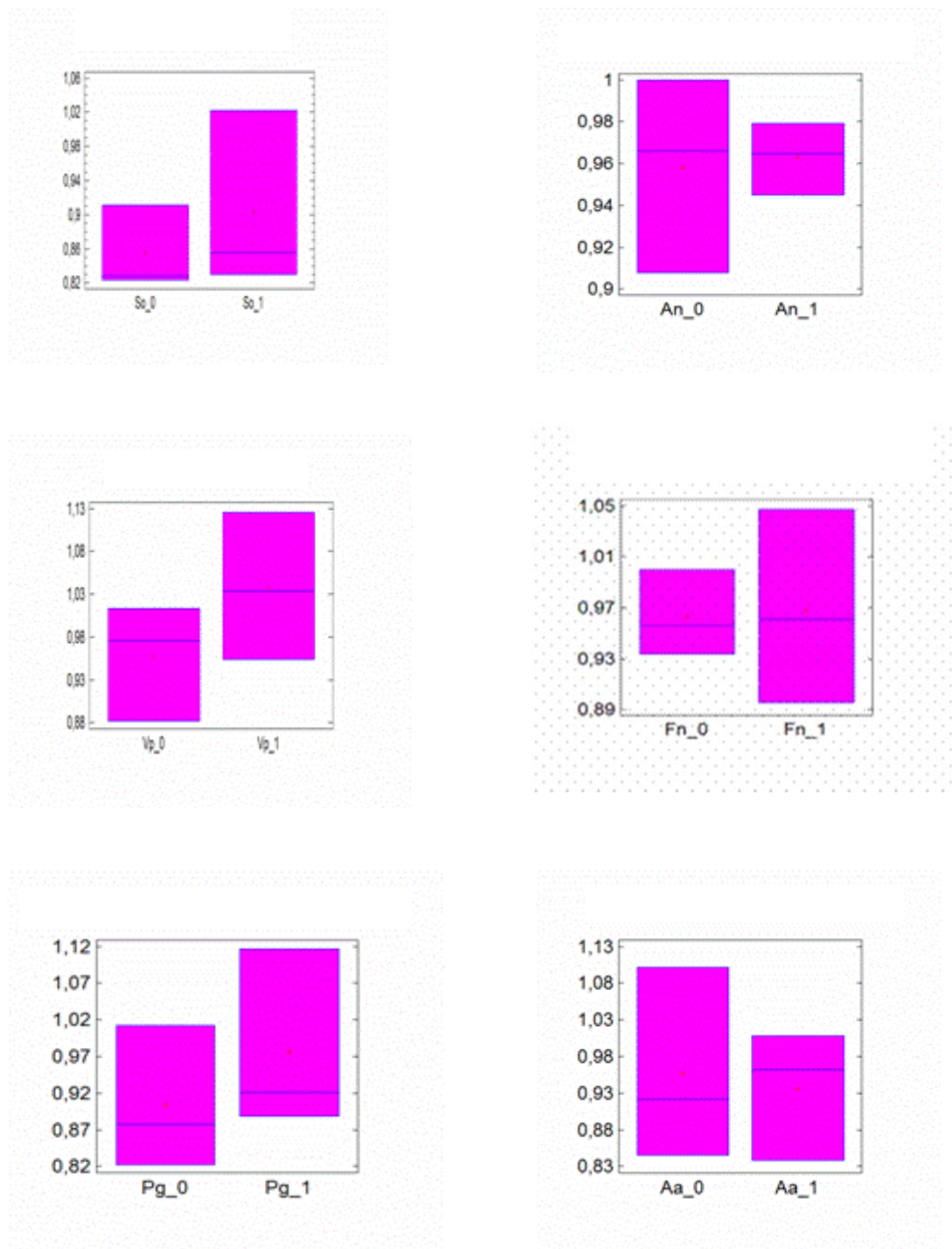


FIGURA 8. Representación gráfica en Box-Plot del logaritmo de las UFC/mL de las 6 especies bacterianas que participaron en el *biofilm*, generado sobre zirconio [Grupo (0)] y titanio [Grupo (1)], tratados con el antiséptico Perioaid®. *So*: *Streptococcus oralis*; *An*: *Actinomyces naeslundii*; *Vp*: *Veillonella parvula*; *Fn*: *Fusobacterium nucleatum*; *Aa*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Pg*: *Porphyromonas gingivalis*.

6. DISCUSIÓN

La formación de *biofilms* bacterianos sobre los implantes dentarios es un importante factor de riesgo para el desarrollo de infecciones, entre ellas las enfermedades peri-implantarias, que pueden desembocar en el fracaso del implante. Este tipo de enfermedad afecta al 12-43% del total de implantes realizados. Las características de las superficies dentales son muy importantes a la hora de obtener éxito en la terapia, y es que la superficie del material restaurador influirá tanto en la osteointegración como en la formación del *biofilm* (Lin et al. 2013).

En este trabajo de investigación se ha realizado un estudio *in vitro* para comparar el efecto de dos agentes antisépticos formulados como colutorios sobre las bacterias, que con más frecuencia se aíslan en el *biofilm* peri-implantario, organizadas en *biofilm* sobre dos de las superficies más utilizadas en la práctica de la implantología. No se han encontrado, de manera general, diferencias estadísticamente significativas en la respuesta de las bacterias organizadas en *biofilm* sobre los dos materiales (zirconio y titanio) tras la exposición a los dos agentes antisépticos probados al comparar con el control. Por tanto, en ambos materiales, las bacterias organizadas en el *biofilm* son igualmente susceptibles a los agentes antibacterianos utilizados. Sin embargo, conviene resaltar que las limitadas diferencias encontradas pueden sugerir un comportamiento más favorable del zirconio: se detectaron diferencias estadísticamente significativas para *A. naeslundii* ($p=0,006$), cuando el *biofilm* formado en Zirconio era tratado con aceites esenciales, respecto a PBS; para *S. oralis* ($p=0,003$), también en *biofilm* formado en Zirconio y tratado con CHX+CPC, respecto al *biofilm* tratado con PBS; y *A. naeslundii* ($p=0,031$), se formó significativamente menos en los *biofilms* tratados con aceites esenciales sobre zirconio, con respecto a los formados sobre titanio.

El titanio es un metal abundante en la naturaleza; se considera que es el cuarto metal estructural industrial. No se encuentra en estado puro sino en forma de óxidos, en la escoria de ciertos minerales de hierro y en las cenizas de animales y plantas. Su utilización se ha generalizado con el desarrollo de la tecnología aeroespacial, donde es capaz de soportar las condiciones extremas de frío y calor que se dan en el espacio y en la industria química, por ser resistente al ataque de muchos ácidos; asimismo, este metal tiene propiedades biocompatibles, dado que los tejidos del organismo toleran su presencia, por lo que es factible la fabricación de muchas prótesis e implantes de este metal.

Por otro lado, el zirconio es un metal de transición brillante, de color blanco grisáceo, duro, resistente a la corrosión, de apariencia similar al acero. Los minerales más importantes en los que se encuentra son el circón (ZrSiO_4) y la badeleyita (ZrO_2), aunque debido al gran parecido entre el circonio y el hafnio (no hay otros elementos que se parezcan tanto entre sí) realmente estos minerales son mezclas de los dos; los procesos geológicos no han sido capaces de separarlos. Se utiliza sobre todo en reactores nucleares (por su baja sección de captura de neutrones). También se emplea como refractario y opacificador, y en pequeñas cantidades como agente de aleación para su fuerte resistencia a la corrosión.

Es importante un estudio comparativo entre los dos materiales pues presentan nuevas posibilidades de tratamiento en implantología. El empleo del zirconio aporta grandes beneficios estéticos, presentando características físico-químicas semejantes al titanio. La posibilidad del desarrollo de infecciones después de la cirugía de colocación de implantes hace necesario estudios que evalúen el comportamiento de las bacterias en ambos materiales, por ejemplo frente al uso de antisépticos, que suelen ser indicados en el pre y post operatorio de cirugías para la colocación de los mismos.

En primer lugar, los microorganismos incluidos en el modelo *in vitro* de *biofilm* peri-implantario están en concordancia con la microbiota existente en implantes *in vivo*, tanto con microorganismos asociados con implantes sanos como con implantes fracasados (Furst et al. 2007; Mombelli et al. 1987; Shibli et al. 2008).

Los resultados obtenidos en este estudio preliminar han demostrado que no se observan diferencias estadísticamente significativas al compararel comportamiento de las bacterias incluidas en un modelo *in vitro* de biofilmen las dos superficies estudiadas, titanio y zirconio, después del tratamiento con dos formulaciones: Perioaid tratamiento® (Dentaïd, Cerdanyola, España) que contiene 0,12% CHX y 0,05% CPC como principios activos, sin alcohol (CHX/CPC) y Listerine® (Johnson & Johnson, Madrid, España) que contiene una mezcla de aceites esenciales como principio activo, (timol 0,06%, eucalipto 0,09%, metil salicilato 0,06%, y mentol 0,01%) en solución alcohólica.

Las bacterias respondieron siguiendo el mismo patrón frente a la exposición a los antisépticos en ambas superficies, pese al hecho observado en un trabajo anterior de una diferente disposición estructural de los *biofilms* generados en ambas superficies, que pudiera hacer diferente su susceptibilidad a los principios activos.

Los resultados obtenidos corroboran lo observado por otros autores en cuando a la colonización de ambos materiales por bacterias orales, no observándose diferencias significativas en la adhesión bacteriana entre ambos, el titanio y el zirconio, tanto *in vivo* como *in vitro* (Lee et al. 2011; Do Nascimento et al. 2013; Fernández, 2013), sugiriendo que los procesos infecciosos peri-implantarios, como mucositis y peri-implantitis se desarrollarían de la misma forma, tanto en la superficie de titanio como en la superficie de zirconio, donde no hay diferencias con respecto al tipo de material restaurador empleado (Sánchez Salmerón, 2008).

Igualmente, estos resultados obtenidos coinciden con lo descrito por otros autores, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. De manera general, hemos podido observar como en ambos materiales de implantes, titanio y zirconio, se produce una reducción en el número de bacterias tras el tratamiento con ambas formulaciones, aunque sin ser significativo excepto para los colonizadores primarios *S.oralis* y *A. naeslundii*. En referencia a lo observado por otros autores que estudian la respuesta de las bacterias a tratamientos antimicrobianos, presentes en el *biofilm* peri-implantario generado sobre ambos materiales, los resultados coinciden con lo postulado de como ambos materiales presentan características similares cuando son sometidos a condiciones bucales de salud y de tratamiento (Egawa et al. 2013). Bressan y colaboradores (Bressan et al. 2014) afirman que *in vivo*, la CHX formulada como colutorio limita la formación de placa sobre el pilar en pacientes rehabilitados con implantes osteointegrados, contribuyendo estas formulaciones a la actuación mecánica del cepillado. Por otro lado, Charalampakis y colaboradores (Charalampakis et al. 2014) encuentran igualmente reducción en la carga bacteriana tras el tratamiento con CHX *in vivo* en biofilms maduros generados en férulas parciales de pacientes sobre diferentes superficies de implantes, pero sin ser estas diferencias significativas, siendo el tratamiento incapaz de eliminar por completo el *biofilm*, incluso complementando el tratamiento con limpieza mecánica. Coincidiendo con nuestros resultados, en este caso tampoco encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los *biofilms* tratados con CHX y los tratados con la solución de taponisalino como control. Al-Radha y colaboradores (Al-Radha et al. 2013), en un modelo *in vitro* de *biofilm* oral compara el efecto de formulaciones basadas en aceites esenciales sobre los *biofilms* en superficies de titanio y zirconio, sin detectar diferencias significativas en el efecto antibacteriano de estas formulaciones en función de la superficie, al igual que hemos observado en nuestro estudio, donde no se encuentran

diferencias significativas para cada formulación al comparar la reducción bacteriana tras el tratamiento en ambas superficies.

Asimismo, estos resultados complementan lo observado por otros autores, que postulan que no hay diferencias significativas entre el comportamiento físico-químico del titanio comparado con el zirconio (Stadlinger et al. 2010; Gahlert et al. 2011). Esto favorece el desarrollo de técnicas quirúrgicas con mejores posibilidades de tratamiento, es decir, amplía el número de recursos para el tratamiento implantológico (Hefti et al. 2010). El zirconio se está convirtiendo en un tipo de material restaurador muy adecuado para diversos procedimientos odontológicos como prótesis, implantes o incluso prótesis sobre implantes (Ralph van Brakel et al. 2010). Las ventajas estéticas de este material son superiores a las del titanio, presentando características físico-químicas semejantes al titanio (Afya Sahib Diab A-Radha, 2012).

7. CONCLUSIONES

1. Este estudio demuestra, de forma preliminar, que las especies bacterias utilizadas en el modelo de biofilm oral *in vitro*, representativo de la placa peri-implantaria, y desarrollados sobre dos superficies de implantes, titanio y zirconio, responden de la misma manera al tratamiento con dos principios activos formulados como colutorios, aunque se detectaron diferencias estadísticamente significativas para *A. naeslundii* ($p=0,006$), cuando el biofilm formado en Zirconio era tratado con aceites esenciales, respecto a PBS, y para *S. oralis* ($p=0,003$), también en biofilm formado en Zirconio y tratado con CHX+CPC, respecto al biofilm tratado con PBS.
2. En general, no se han observado diferencias estadísticamente significativas al comparar los ratios de vitalidad de las 6 especies bacterianas incluidas en los *biofilms* generados en ambas superficies, titanio y zirconio, tras la exposición a los dos colutorios, uno con aceites esenciales y otro con clorhexidina y cloruro de cetil piridinio, aunque el crecimiento de *A. naeslundii* fue significativamente inferior ($p=0,031$) en los biofilms tratados con aceites esenciales sobre zirconio, con respecto a los formados sobre titanio.
3. Los resultados demuestran, de forma preliminar, que los dos materiales de implantes, el zirconio y el titanio, no afectan al comportamiento bacteriano frente a diferentes agentes antimicrobianos, aunque estos resultados pueden sugerir un comportamiento más susceptible del biofilm formado sobre zirconio.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a mi tutor, el Dr. David Herrera, por darme esta oportunidad.

Igualmente, agradecimiento a todo el personal del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología, en especial a María Sánchez Beltrán, ya que sin su ayuda y dedicación no me habría sido posible realizar este trabajo.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Al-Radha ASD, Dymoc D, Younes C & O'Sullivan (2012). Surface properties of titanium and zirconia dental implant materials and their effect on bacterial adhesion. *Journal of Dentistry*. 40: 146-153.
2. Al-Radha AS, Younes C, Diab BS, Jenkinson HF (2013). Essential oils and zirconia dental implant materials. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. Nov-Dec;28(6):1497-505.
3. Brakel RV, Cune MS, Winkelhoff AJV, Putter C, de Verhoeven W & Reijden WVD (2011). Early bacterial colonization and soft tissue health around zirconia and titanium abutments: an *in vivo* study in man. *Clin Oral Implan Research* 22, 574-77.
4. Berglundh T, Persson L & Klinge B (2002). A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J. Clin. Periodontol.* 29: Suppl 3, 197-212.
5. Binon PP, Weir DJ & Marshall SJ (1992). Surface analysis of an original Branemark implant and three related clones. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*: 7, 168-175.
6. Bravo-Pérez M., Casals-Pedró E., Cortés-Martínez FJ & Llodra-Calvo, JC (2006). Encuesta de Salud Oral en España 2005. *RCOE* 11, 409-456.
7. Bressan E, Tessarolo F, Sbricoli L, Caola I, Nollo G & Di Fiore A (2014). Effect of chlorhexidine in preventing plaque biofilm on healing abutment: a crossover controlled study. *Implant Dent.* Feb;23(1):64-8.
8. Charalampakis G, Ramberg P, Dahlén G, Berglundh T & Abrahamsson (2014). Effect of cleansing of biofilm formed on titanium discs. *Clin Oral Implants Res.* Apr 16.

9. Do Nascimento C, Pita MS, Fernandes FHNC, Pedrazzi V, de Albuquerque Junior RF & Ribeiro RF (2013). Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 00:1-7.
10. Esposito M, Worthington HV & Coulthard P (2004). Interventions for replacing missing teeth: treatment of periimplantitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 4:CD004970.
11. Egawa M, Miura T, Kato T, Saito A & Yoshinari M (2013). *In vitro* adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surfaces. *Dental Material Journal* 32(1):101-106.
12. Fernández EV (2013). Formación de biofilms bacterianos sobre distintas superficies de implantes. Trabajo fin de Máster en Ciencias Odontológicas.
13. Furst MM, Salvi GE, Lang NP & Persson GR (2007). Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implants Res*;18:501-8.
14. Gahlert M, Roehling S, Sprenger CM, Kniha H, Milz S & Bormann K (2012). *In vivo* performance of zirconia and titanium implants: a histomorphometric study in mini pig maxillae. *Clin Oral Impl Res* 23, 281-286.
15. Hefti T, Frischherz M, Spencer ND, Hall H & Schlottig (2010). A comparison of osteoclast resorption pits on bone with titanium and zirconia surfaces. *Biomaterials* 31, 7321-7331.
16. Lin HY, Liu Y, Wismeijer D, Crileard W & Deng DM (2013). Effects of Oral Implant Surface Roughness on Bacterial Biofilm Formation and Treatment Efficacy. *Int J Maxillofac implants*;28: 1226-1231.

17. Jansen VK, Conrads G& Richter EJ. (1997) Microbial leakage and marginal fit of the implant abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12, 527-540.
18. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR,& O'Brien K (2012). Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol*, 39:425-433.
19. Lang NP & Berglundh T (2011). Periimplant diseases: where are we now?--Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* 38 Suppl 11, 178-181-
20. Lee A&Wang HL (2010). Biofilm related to dental implants. *Implant Dent* 19:387-393.
21. Lee B-C, Jung G-Y, Kim D-J & Han JS (2011). Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro. *J Adv Prosthodont*; 3:81-4.
22. Lindhe, Karring, Lang. Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. 4º ed, 2009. Editorial Medica Panamericana.
23. Lindhe, J&Meyle J (2008). Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 35: 282-285.
24. Lindquist LW, Carlsson GE&Jemt T (1988). Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res* 76, 1667-1674.
25. Llodra-Calvo JC, Bravo-Pérez M& Cortes-Martinicorena FJ (2002). Encuesta de Salud Oral en España. *RCOE* 7, 19-63.
26. Molina Blanco J&Aguirre Zorzano LA (1994). Periimplantitis: Etiología, Clínica y Tratamiento. Revisión de la Literatura. *Periodoncia* 2000; vol. 10 nº3.

27. Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr, & Land NP. (1987) The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 2:145-151.
28. Quirynen M & Bollen CM (1995). The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol* 22: 1-14.
29. Quirynen M, Papaioannou W & van Steenberghe TJM (1996). Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces. *J Periodontol* 67, 986-993.
30. Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I & Haffajee (2006) A. Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res* 17:25-37.
31. Sánchez MC, Lima-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D & Sanz M (2011). Structure, viability and bacterial kinetics of an *in vitro* biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodont Res* 46:252-260.
32. Sánchez Salmerón, JT (2008). Periimplantitis: protocolo clínico y terapéutico. *Cient. Dent.* Vol. 5 Núm. 1 Abril 2008. P.55-69.
33. Sheiham A & Netuveli GS. (2002) Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000 29, 104-121.
34. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Faveri M & Feres M. (2008) Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 19:975-982.

35. Stadlinger B, Henning M, Eckelt U Kuhlisch E & Mai R (2010). Comparison of zirconia and titanium implants after a short healing period. A pilot study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 39: 585-592.
36. Tabanella G, Nowzari H& Slots J.(2009) Clinical and microbiological determinants of failing dental implants. *Clin Implant Dent Relat Res* 11:24-36.
37. van Winkelhoff AJ, Goené RJ, Benschop C&Folmer T (2000). Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 11, 511-520.
38. van Winkelhoff AJ& Wolf JWA. (2008) Actinobacillus actinomycetemcomitans associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. *J Clin Periodontol* 27, 531-533.
39. VADEMECUM, Guia de consulta farmacológica (2013).
40. Wennerberg A& Albrektsson T(2010). On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 25: 63-74.
41. Zitzmann, N.U. & Berglundh, T. (2008) Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol* 35, 286-291.

